

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : G01N 33/543, 33/53, 33/50		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/45739
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	4. Dezember 1997 (04.12.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/02662		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Mai 1997 (23.05.97)			
(30) Prioritätsdaten: 196 21 312.6 28. Mai 1996 (28.05.96) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); D-51368 Leverkusen (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRAHN, Thomas [DE/DE]; Wiener Strasse 29, D-58135 Hagen (DE). PAFFHAUSEN, Wolfgang [DE/DE]; Dürscheider Weg 17, D-51381 Leverkusen (DE). SCHADE, Andreas [DE/DE]; Krümmingsfeld 1b, D-45277 Essen (DE). BECHEM, Martin [DE/DE]; Hans-Böckler-Strasse 102, D-42111 Wuppertal (DE). SCHMIDT, Delf [DE/DE]; Am Eckbusch 55b, D-42113 Wuppertal (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).			
(54) Title: MASKING BACKGROUND FLUORESCENCE AND LUMINESCENCE IN OPTICAL ANALYSIS OF BIOMEDICAL ASSAYS			
(54) Bezeichnung: MASKIERUNG DER HINTERGRUNDFLUORESCENZ UND -LUMINESZENZ BEI DER OPTISCHEN ANALYSE BIOLOGISCH MEDIZINISCHER ASSAYS			
(57) Abstract			
<p>In a procedure for quantitative optical analysis of fluorescently-labelled biological cells (5) a cell layer is applied to a transparent carrier at the base (2) of a reaction vessel (1) so that it is in contact with the solution (3) containing the fluorescent dye (4). The sensitivity of the determination may be significantly improved by adding to the solution (3) a masking dye (9), which absorbs the exciting light (6) for the fluorescent dye (4) already present in the solution (3) and/or its emitted light (7), and/or by applying an interlayer (10) that is permeable to the solution but absorbs and/or reflects the exciting light (6) or the emitted light (7) to the cell layer at the base (2). The same procedure may be used to improve sensitivity in quantitative optical analysis of a luminescent biological cell layer. In the latter case the interlayer (10) should be composed so that it possesses a high reflection factor with respect to luminescent light (11). Analogously, these procedural principles may also be applied in receptor studies to mask disturbing background radiation in quantitative optical analysis of fluorescently- or luminescently-labelled participants in a reaction. In this case a receptor layer (12) is placed at the base (2) of a reaction vessel (1) in contact with a solution (supernatant 3) in which a fluorescent or luminescent ligand (13) has been dissolved. The sensitivity and accuracy of the determination may be significantly improved if a masking dye (9) which absorbs the exciting light (6) for the fluorescent dye and/or its emitted light or (in case of luminescent ligands) the luminescent light is added to the supernatant (3). An interlayer (10) that is permeable to the solution (3) but absorbs and/or reflects the exciting light (6) and/or the emitted light or the luminescent light may be applied to the cell or receptor layer (12) at the base (2) instead of the masking dye in the solution (3) or possibly as a supplementary measure.</p>			

### (57) Zusammenfassung

Bei einem Verfahren zur quantitativen optischen Analyse von fluoreszenzmarkierten biologischen Zellen (5) steht eine Zellschicht auf einem transparenten Träger am Boden (2) eines Reaktionsgefäßes (1) mit einer den Fluoreszenzfarbstoff (4) enthaltenden Lösung (3) in Kontakt. Die Empfindlichkeit des analytischen Nachweises kann erheblich verbessert werden, wenn der Lösung (3) zusätzlich zu dem bereits vorhandenen Fluoreszenzfarbstoff (4) ein Maskierungsfarbstoff (9) hinzugegeben wird, welcher das Anregungslicht (6) für den Fluoreszenzfarbstoff (4) und/oder sein Emissionslicht (7) absorbiert und/oder wenn auf die Zellschicht am Boden (2) eine für die Lösung durchlässige, das Anregungslicht (6) oder das Emissionslicht (7) absorbierende und/oder reflektierende Trennschicht (10) aufgebracht wird. Dieses Verfahren kann auch zur Verbesserung der Empfindlichkeit bei der quantitativen optischen Analyse einer lumineszenten biologischen Zellschicht angewandt werden. Die Trennschicht (10) muß in diesem Fall so beschaffen sein, daß sie ein hohes Reflexionsvermögen für das Lumineszenzlicht (11) besitzt. In analoger Weise können diese Verfahrensprinzipien auch bei Rezeptorstudien zur Maskierung der störenden Hintergrundstrahlung bei der quantitativen optischen Analyse von Fluoreszenz- oder Lumineszenz-markierten Reaktionspartnern angewendet werden. In diesem Fall steht eine Rezeptorschicht (12) am Boden (2) eines Reaktionsgefäßes (1) mit einer Lösung (Überstand 3) in Kontakt, in der ein fluoreszierender oder lumineszierender Ligand (13) gelöst ist. Die Empfindlichkeit und Genauigkeit des analytischen Nachweises können dabei erheblich verbessert werden, wenn dem Überstand 3 ein Maskierungsfarbstoff (9) hinzugegeben wird, welcher das Anregungslicht (6) für den Fluoreszenzfarbstoff und/oder sein Emissionslicht oder (im Falle von lumineszenten Liganden) das Lumineszenzlicht absorbiert. Anstelle des Maskierungsfarbstoffes in der Lösung (3) oder ggf. als zusätzliche Maßnahme kann auf die Zell- bzw. Rezeptorschicht (12) am Boden (2) eine für die Lösung (3) durchlässige, das Anregungslicht (6) und/oder das Emissionslicht bzw. das Lumineszenzlicht absorbierende und/oder reflektierende Trennschicht (10) aufgebracht werden.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Maskierung der Hintergrundfluoreszenz und -lumineszenz bei der optischen Analyse biologisch medizinischer Assays

5

Die Erfindung geht aus von einem Verfahren zur quantitativen optischen Analyse von fluoreszenzmarkierten biologischen Zellen, die mit einer Fluoreszenzfarbstofflösung in Kontakt stehen oder von lumineszenten Zellen, die in Form einer zusammenhängenden Zellschicht auf einem transparenten Träger am Boden eines Reaktionsgefäßes aufgebracht sind, oder auch von Fluoreszenz- oder Lumineszenz-markierten Reaktionspartnern in einer Lösung, in der ein fluoreszierender oder lumineszenter Ligand gelöst ist, wobei die Lösung mit einer für diesen Ligand spezifischen, am transparenten Träger am Boden des Reaktionsgefäß befindlichen Rezeptorschicht in Kontakt steht, deren für die Rezeptor-Liganden Bindung charakteristische Fluoreszenz- oder Lumineszenzstrahlung durch den transparenten Boden hindurch erfaßt und ausgewertet wird.

Ein Problem bei der Fluoreszenzmessung in biologisch medizinischen Assays besteht häufig darin, daß die mit der biologischen Zellaktion korrelierten Fluoreszenzänderungen klein gegenüber der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz sind. Dadurch wird das Auflösungsvermögen stark eingeschränkt. Herkömmliche kommerzielle Meßsysteme (Fluoreszenzreader, Fa. Dynatech bzw. SLT) können das Problem nicht lösen, weil durch ihre optischen Meßanordnung (Anregung von 'oben' durch die fluoreszente Flüssigkeitssäule des Überstands) das Signal im Vergleich zum Hintergrund kaum detektiert werden kann. Geräte neuerer Konstruktion (Fa. Labsystems), die die Zellen von der Rückseite durch den transparenten Träger des Reaktionsgefäßes beleuchten, haben zwar den Vorteil, daß bei Eintritt des Anregungslichts die Zellen zur Fluoreszenz angeregt werden. Da das Anregungslicht aber weiter in den ebenfalls fluoreszenten Überstand eintritt, läßt es sich nicht vermeiden, daß das unspezifische Hintergrundsignal das Zellsignal verfälscht. Selbst sehr aufwendige Meßsysteme (Fa. NovelTech, FLIPR: Fluorescence Imaging Plate Reader) können mit einer speziellen Laser-Beleuchtungsgeometrie (Anregung unter ca. 45°) diese Hintergrundfluoreszenz nur vermindern. Grund für das Scheitern aller Problemlösungs-

versuche über die Meßgeometrie ist der Umstand, daß hierüber die eigentliche Ursache für die Hintergrundfluoreszenz nicht entscheidend beeinflußt werden kann.

Bei den bisher durchgeführten Rezeptor-Bindungstudien mit Fluoreszenz- oder Lumineszenz-markierten Liganden muß der jeweils markierte und nicht gebundene Anteil durch waschähnliche Vorgänge entfernt werden. Viele Beschichtungen sind jedoch empfindlich für diese Waschschrirte. Außerdem ist das Entfernen des ungebundenen Liganden mit einem beträchtlichen Aufwand verbunden. Die direkte Messung der Rezeptor-Ligand Assoziation bzw. Dissoziation ist bei diesem Verfahren nicht möglich.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Empfindlichkeit der optischen Analyse von fluoreszenzmarkierten oder lumineszenten Zellen in einem zellulären Assay zu verbessern, um z. B. möglichst geringe Membranpotentialänderungen auf der Basis von Fluoreszenzänderungen potentialsensitiver Farbstoffe messen zu können. Dabei soll die Empfindlichkeit des Meßsystems so hoch sein, daß sich Potentialänderungen unter 5 mV mindestens qualitativ nachweisen lassen. Im Falle von lumineszenten Zellen soll eine Steigerung in der Detektion des Lumineszenzsignals erreicht werden. Außerdem soll die Methode für ein Screening mit hohem Probendurchsatz geeignet sein.

Weiterhin liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, Rezeptor-Bindungsstudien auf der Basis von Fluoreszenz- bzw. Lumineszenz-markierten Liganden bzw. Rezeptoren zu vereinfachen und eine kontinuierliche Messung der Rezeptor-Bindungsinteraktion (Kinetik) zu ermöglichen. Durch die Reduzierung der erforderlichen Verfahrensschritte soll diese Methode insbesondere für ein Screening mit hohem Durchsatz und für diagnostische Anwendungen geeignet sein.

Die geforderte hohe Auflösung bei geringen Membranpotentialänderungen konnte erst erzielt werden, nachdem die Ursache für die störende Überlagerung der unspezifischen Hintergrund- und der spezifischen Fluoreszenz der Zellen beseitigt werden konnte. Das hierzu entwickelte erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der grundsätzlich neuen Idee, die Anregungsenergie und die nicht von dem biologischen

Objekt stammende Fluoreszenz zu maskieren. Hierzu wird neben dem Fluoreszenzfarbstoff ein weiterer Farbstoff hinzugefügt, der das Anregungslicht des Fluoreszenzfarbstoffs und/oder dessen Emissionslicht vollkommen absorbiert, ohne die Fluoreszenz der Zellen zu beeinflussen. Durch diese Absorption wird erreicht, daß das unspezifische Hintergrundsignal maskiert und das Zell-Nutzsignal mit einer bisher nicht möglichen Auflösung detektiert werden kann.

Eine im Rahmen der Erfindung liegende Alternativlösung besteht darin, daß auf die Zellschicht eine für die Lösung durchlässige Trennschicht aufgebracht wird, die das Anregungslicht für den Fluoreszenzfarbstoff und/oder sein Emissionslicht absorbiert und/oder reflektiert, ohne die Zelleigenschaften negativ zu beeinflussen. Dabei wird die Dicke der Trennschicht so gewählt, daß im Lösungsansatz mit dem Fluoreszenzfarbstoff aber ohne die Zellen keine Fluoreszenz mehr nachweisbar ist.

Eine weitere Variante der Erfindung besteht darin, daß die Methode der erfindungsgemäßen Trennschicht auch zur Empfindlichkeitssteigerung bei der quantitativen optischen Analyse von lumineszenten (selbstleuchtenden) biologischen Zellen verwendet wird, die in Form einer zusammenhängenden Zellschicht auf einem transparenten Träger aufgebracht sind. Zu diesem Zweck werden die optischen Eigenschaften, der für die Lösung durchlässigen Trennschicht so gewählt, daß sie das Lumineszenzlicht möglichst stark reflektiert, ohne die Zelleigenschaften negativ zu beeinflussen. Auf diese Weise kann die Lumineszenzintensität und damit der Meßeffect beträchtlich erhöht werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in ganz analoger Weise zur quantitativen optischen Analyse von Fluoreszenz- oder Lumineszenz-markierten Reaktionspartnern in einem mit einer Lösung gefüllten Reaktionsgefäß herangezogen werden, wobei der fluoreszierende oder lumineszente Ligand in gelöster Form vorliegt und die Lösung mit einer für diesen Ligand spezifischen, auf einem transparenten Träger am Boden des Reaktionsgefäß aufgetragenen oder sich darauf absetzenden Rezeptorschicht in Kontakt steht, deren für die Rezeptor-Liganden Bindung charakteristische Fluoreszenz- oder Lumineszenzstrahlung durch den transparenten Boden hindurch erfaßt und ausgewertet wird. In diesem Fall beruht die erfindungsgemäße Lösung der oben

beschriebenen Aufgabe darauf, daß der sich im Überstand, d.h. in Lösung befindliche freie Ligand und dessen unspezifische Fluoreszenz oder Lumineszenz durch einen zusätzlichen Farbstoff und/oder durch eine diffus absorbierende oder reflektierende Trennschicht maskiert wird und damit die Ursache für die störende Überlagerung der unspezifischen Hintergrund- und der spezifischen Fluoreszenz der Liganden in der Lösung beseitigt wird. Da auf diese Weise der nicht gebundene Ligand maskiert wird, stellt die gemessene Fluoreszenz oder Lumineszenz ein direktes Maß für die Interaktion Ligand-Rezeptor dar. Sie kann bei diesem Verfahren zeitlich aufgelöst direkt gemessen werden.

Gegenstand der Erfindung ist also bei Rezeptorstudien in Analogie zu dem oben beschriebenen Verfahren eine Verfahrensvariante, bei der der Lösung ein Maskierungsfarbstoff hinzugefügt und/oder auf die Rezeptorschicht eine für die Lösung durchlässige Trennschicht aufgebracht wird, wobei die optischen Eigenschaften des Maskierungsfarbstoffs und/oder der Trennschicht so gewählt werden, daß das Anregungslicht für den Fluoreszenzfarbstoff des in der Lösung vorhandenen Liganden und/oder sein Emissionslicht oder sein Lumineszenzlicht von der Lösung oder der Trennschicht absorbiert oder an der Trennschicht reflektiert wird. Dabei wird die Dicke der Trennschicht so gewählt, daß im Lösungsansatz mit dem Fluoreszenzfarbstoff, aber ohne die Rezeptorschicht, keine Fluoreszenz mehr nachweisbar ist.

Vorzugsweise besteht die Trennschicht aus polymeren Latexkügelchen (z.B. Polystyrol, Polyurethan, Butadien Acrylnitril). Die Latexkügelchen können dabei auch mit einem Maskierungsfarbstoff gefärbt sein, der in diesem Fall eine hinreichend große Polymeranfärbbarkeit aufweisen muß.

Bei dem zuerst erwähnten Verfahren soll sich der Maskierungsfarbstoff möglichst gut in der Lösung, die auch den Fluoreszenzfarbstoff in gelöster Form enthält, verteilen. Da das Lösungsmittel in der Regel Wasser ist, wird zweckmäßig ein Maskierungsfarbstoff eingesetzt, der eine gute Wasserlöslichkeit besitzt ( $>2\text{g/ml}$ ) und keine zelltoxischen Nebeneffekte aufweist.

Gemäß einer Weiterentwicklung der Erfindung wird nach dem Austausch des einen Fluoreszenzfarbstoff enthaltenden Überstandes durch eine Fluoreszenzfarbstoff-freie Lösung ein weiterer Maskierungsfarbstoff zugegeben, welcher eine unspezifische Fluoreszenz an der Reaktionsgefäßwand unterdrückt.

5

Mit der Erfindung werden folgende Vorteile erzielt:

Das beschriebene neue Verfahren ist nicht an ein bestimmtes Meßsystem gebunden, sondern kann, weil es keine spezifisch technische Lösung darstellt, von vielen handelsüblichen Geräten benutzt werden. Hierzu zählen praktisch alle Fluoreszenzreader, die transparenten Reaktionsgefäße z.B. Mikrotiterplatten von der Unterseite her beleuchten und auch messen können. Mit einem sehr geringen Aufwand (minimale Zusatzkosten nur für die speziellen Absorptionsfarbstoffe) wird es hierdurch erstmals möglich, in einen Auflösungsbereich z.B. bei der Messung von Potentialänderungen in Zellmembranen durch Messung der Fluoreszenzänderung potentialsensitiver Fluoreszenzfarbstoffe vorzudringen, der bisher unerreicht war. Erstmals wird es möglich, auch bei sehr kleinen Änderungen einen direkten Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenen Reaktionsgefäßen (z.B. verschiedene Vertiefungen in einer Mikrotiterplatte) durchzuführen, so daß auf das aufwendige Verfahren der Bestimmung der relativen Änderung in einem Reaktionsgefäß verzichtet werden kann. Dadurch verringert sich die Anzahl der zu erfassenden Meßwerte z.B. für Kinetikmessungen. Der zeitliche Aufwand für ein Meßprogramm wird deutlich reduziert und die Möglichkeit geschaffen, durch eine simple Einzelmessung (z.B. Endpunktbestimmung) unter Verwendung des Bezugs auf einen getrennten Kontrollansatz gleiche Resultate zu erhalten. Die hierbei geforderte Uniformität des biologischen Ansatz (z.B. homogene Zellschicht) ist z.B. für Mikrotiterplatten im allgemeinen gegeben.

30

Überraschenderweise zeigte die Anwendung verschiedener wasserlöslicher Farbstoffe und auch deren Mischungen in den verschiedensten getesteten Zellen keine negative Auswirkung auf die Physiologie der Zellen (z.B. Reaktion der Zellen im Vergleich zu elektrophysiologischen Messungen wie Whole-cell-patch-clamp, bzw. Effekte der untersuchten Pharmaka). Auch der Einsatz von unlöslichen Farbpigmenten bzw. anorganischen feinverteilten Teilchen wurde erstaunlich gut von den biologischen Objekten toleriert.

Durch das beschriebene einfache Verfahren der Maskierung der Hintergrundfluoreszenz bei der quantitativen Fluoreszenzmessung in biologisch medizinischen Assays verbunden mit einer Steigerung der Empfindlichkeit z. B. beim Einsatz von potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen und die Adaptionfähigkeit dieses Verfahrens z.B. auf Mikrotiterplatten als Reaktionsgefäße wird der Einsatz solcher Meßtechniken das High-Throughput-Screening wesentlich vereinfachen, zumal zur Realisierung der geschilderten Vorteile kein erhöhter technischer Aufwand notwendig ist, sondern vorhandene kommerzielle Meßgeräte dazu ausreichen.

Bei Rezeptor-Liganden Studien liegt der erfindungswesentliche Vorteil darin, daß es aufgrund der Maskierung der unspezifischen Fluoreszenz bzw. Lumineszenz nicht mehr erforderlich ist, den nicht gebundenen Anteil der Liganden zu entfernen. Dadurch werden die Testverfahren erheblich vereinfacht, Beschädigungen und Zerstörungen der empfindlichen Beschichtungen bzw. der biologischen Objekte wie z.B. Zellen, vermieden und die Empfindlichkeit und damit auch die Genauigkeit der Messung verbessert. Durch die Verwendung von Mikropartikeln kann die nutzbare Oberfläche zur Beschichtung von Fluoreszenz- oder Lumineszenz-markierten Liganden wesentlich vergrößert werden. Durch geeignete Maßnahmen, z.B. höhere spezifische Dichte bzw. die Verwendung von magnetisierbaren Partikeln, kann erreicht werden, daß sich die Mikropartikel am transparenten Träger absetzen und anreichern. Auch in diesem Fall wird die Fluoreszenz bzw. Lumineszenz der nicht gebundenen, im Überstand befindlichen Liganden durch die Maskierung wirkungsvoll unterdrückt.

Da die Interaktion zwischen dem Liganden und dem Rezeptor nicht durch das Entfernen des ungebundenen Anteils unterbrochen werden muß, kann auf diese Weise sogar in einem einzelnen Reaktionsansatz eine kontinuierliche Messung der Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor (Kinetik) erfolgen.



Im Folgenden wird die Erfindung an Hand von Ausführungsbeispielen und Zeichnungen näher erläutert: Es zeigen:

Fig. 1 ein Reaktionsgefäß für einen Fluoreszenzassay nach dem Stand der Technik

5

Fig. 2 die Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz bei einem Fluoreszenzassay mit einem Maskierungsfarbstoff im Überstand

Fig. 3 die spektrale Anregung und Emission für einen Verteilungsfarbstoff und die spektrale Absorption des Maskierungsfarbstoffes

10

Fig. 4 die ortsabhängige Zellfluoreszenz ohne Maskierungsfarbstoff

Fig. 5 die ortsabhängige Zellfluoreszenz mit Maskierungsfarbstoff

15

Fig. 6 die Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz bei einem Fluoreszenzassay mit Hilfe einer Trennschicht

Fig. 7 die Verstärkung der Lumineszenz durch Rückreflexion an einer Trennschicht

20

Fig. 8 die Wandfluoreszenz bei einem Fluoreszenzassay nach dem Stand der Technik

Fig. 9 die Unterdrückung der Wandfluoreszenz bei einem Fluoreszenzassay mit Hilfe eines Maskierungsfarbstoffes und

25

Fig. 10 die Unterdrückung der Hintergrund-fluoreszenz oder lumineszenz bei einem Fluoreszenz- oder Lumineszenzassay zur Untersuchung von Rezeptor-Ligandenbindungen mit Hilfe eines Maskierungsfarbstoffs im Überstand

30

In Fig. 1 ist ein Reaktionsgefäß 1 für ein Fluoreszenzassay mit einem transparenten Boden 2 dargestellt. In dem Reaktionsgefäß 1 befindet sich eine Fluoreszenzfarbstofflösung 3, in der die Fluoreszenzfarbstoffmoleküle 4 schematisch angedeutet sind. Die Lösung 3 wird auch als Überstand bezeichnet. Auf dem transparenten Boden 2 sind

die zu untersuchenden biologischen Zellen auf einem transparenten Träger angeordnet. Durch den Boden 2 wird Licht (Anregungslicht) 6 eingestrahlt, um die Zellen 5 zur Fluoreszenz anzuregen. Dem von den Zellen 5 ausgestrahlten Fluoreszenzlicht 7 ist eine Hintergrundfluoreszenz-Strahlung 8 überlagert, die von den ebenfalls angeregten Fluoreszenzfarbstoffmolekülen 4 im Überstand 3 herrührt. Für die biologisch-analytische Untersuchung und Auswertung der Zellen 5 ist aber nur das Fluoreszenzlicht 7 maßgebend. Da aber bei allen bekannten Fluoreszenz-Analysegeräten die Hintergrundfluoreszenz 8 mit erfaßt wird, gehen kleine Fluoreszenzunterschiede der Zellen 5 vor der starken Hintergrundfluoreszenz 8 unter, was zu einem deutlichen Empfindlichkeitsverlust führt.

Dieser Nachteil kann durch das erfindungsgemäße Verfahren nach Fig. 2 dadurch vermieden werden, daß die Hintergrundfluoreszenz durch einen Maskierungsfarbstoff im Überstand 3 unterdrückt wird. Die in Fig. 1 vorhandene Hintergrundfluoreszenz 8 wird gem. Fig. 2 vollständig im Überstand absorbiert. Der zu dem Überstand 3 hinzugefügte Maskierungsfarbstoff (schematisch mit 9 bezeichnet) kann entweder in gelöster Form oder in fein verteilter disperser Phase (farbpigmentierte Systeme) vorliegen. Bevorzugt werden jedoch lösliche Farbstoffe eingesetzt, weil hier die Zugabe besonders einfach mit Hilfe einer Pipette erfolgen kann und weil im Gegensatz zu einem Pigment-System die physikalischen Einflüsse der Teilchengrößenverteilung und von Sedimentationsprozessen und Schichtdickenungleichmäßigkeiten nicht berücksichtigt werden müssen.

An die Eigenschaften eines derartigen Farbstoffs werden folgende Anforderungen gestellt:

- bei Verwendung eines löslichen Absorptionsfarbstoffes gute Wasserlöslichkeit für den Einsatz in biologischen Assays
- keine Membrangängigkeit des Farbstoffs, um eine Anfärbung der Zellen zu vermeiden

- hohe spezifische Absorption im Excitations- und/oder Emissions-Wellenlängenbereich des Fluoreszenzfarbstoffes
- keine toxischen Nebeneffekte (Vermeidung von Zellschädigungen)

5

Als gute Wasserlöslichkeit wird eine Löslichkeit von  $>2$  mg/ml angesehen. Die Zelltoxizität kann mit Hilfe bekannter Testverfahren (z.B. Zytotoxizitätstest) bestimmt werden. Fig. 3 zeigt die optischen (spektralen) Eigenschaften eines Fluoreszenz- und eines Maskierungsfarbstoffes in einem Diagramm. Die Kurve A zeigt die spektrale Verteilung des Anregungslichtes, die Kurve B die spektrale Verteilung des emittierten Fluoreszenzlichts für den handelsüblichen Verteilungsfluoreszenz-Farbstoff Bis-(1,3-dibutylbarbituricacid)trimethaneoxonol (Dibac<sub>4</sub>(3)) und die Kurve C die spektrale Transmission (Absorptionsspektrum) des verwendeten Maskierungsfarbstoffs (Brilliant Black BN, C.I. 28440, Food Black 1, z.B. Sigma B-8384). Man erkennt, daß der Maskierungsfarbstoff im Wellenlängenbereich der Anregung und Emission des Fluoreszenzfarbstoffs fast vollständig absorbiert.

Die Kontrastverbesserung bzw. Empfindlichkeitssteigerung läßt sich noch besser an Hand der Figuren 4 und 5 verstehen. Zur Demonstration der Wirkung des Maskierungsfarbstoffs auf die unspezifische Hintergrundfluoreszenz wurden zwei Videoaufnahmen von dem gleichen Bildausschnitt vor und nach Hinzufügen von 100 mg/ml des löslichen Maskierungsfarbstoffes Brillantschwarz in Anwesenheit des potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Dibac<sub>4</sub>(3) (5 mM) gemacht. Beide Male wurden dieselbe Videozeile bildanalytisch ausgewertet und die beiden Fluoreszenzintensitätsprofile über die identischen Ausschnitte im Reaktionsgefäß dargestellt. Der Bereich Z entspricht dabei dem Bereich, in dem sich die Zellschicht, d.h. die biologische Probe befindet, während rechts davon in der Zone Ü zum größten Teil das vom Überstand herkommende Fluoreszenzsignal gemessen wird. Der Meßbereich des Aufnahmesystems (8 bit) liegt zwischen 0 (schwarz) und 255 (weiß). Für die unmaskierte Aufnahme ergibt sich ein Kontrastverhältnis von ca. 1:3,6 (Intensitätsverhältnis der dunkelsten und hellsten Bildanteile) und im Falle der maskierten Aufnahme ein Kontrastverhältnis von ca. 1:14,4. Das entspricht einer Kontraststeigerung um den Faktor 4.

30

Eine alternative Möglichkeit, das Verhältnis von Nutz- zu Hintergrundsignal zu verbessern, besteht gemäß Fig. 6 in einer Überlagerung der Zellschicht mit einer feinteiligen optischen Trennschicht 10. Die Trennschicht 10 besteht zweckmäßig aus einem feinteiligen anorganischen Weißpigment, wie z.B.  $\text{TiO}_2$  oder  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Hierdurch wird nicht nur die Hintergrundfluoreszenzstrahlung aus dem Überstand 3 abgeschirmt, sondern auch die meßbare Größe der Zellfluoreszenz durch Reflexion an den anorganischen Teilchen verstärkt.

Alternativ kann die Trennschicht aus polymeren Latexkügelchen mit einem Durchmesser vorzugsweise im Bereich von 200 nm bis 5 µm bestehen. Geeignete Polymere sind z.B. Polystyrol, Polyurethan, Butadien Acrylnitril. Die Latexkügelchen können auch mit einem geeigneten Maskierungsfarbstoff angefärbt werden, für den die gleichen Kriterien gelten, wie für den der Lösung zugefügten Absorptionsfarbstoff (s. oben). Eine geeignete Farbstoffklasse sind z.B. <sup>6</sup>Resoline.

In Lumineszenz-Assays (selbstleuchtende Zellen) besteht grundsätzlich die Anforderung, die spezifische sehr geringe Lichtintensität einer biologischen Zelle mit hoher Empfindlichkeit zu detektieren. Durch Einbringen einer reflektierenden Trennschicht 10 gemäß Fig. 7 kann, analog zur Methode der Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz (gem. Fig. 6), das Lumineszenzsignal der biologischen Zellen verstärkt werden. Hierbei werden Strahlungsanteile 11 des ungerichteten Lumineszenzlichtes in Richtung des Detektors reflektiert und erhöhen so das spezifische Meßsignal.

Bei einer Vielzahl anderer fluoreszenter Testverfahren an biologischen Zellen ist es im Gegensatz zu Verteilungsfarbstoffen möglich, den Fluoreszenzfarbstoff nach Anfärbung der Zellen durch Lösungswechsel aus dem Überstand zu entfernen. Der Fluoreszenzfarbstoff FURA2-AM wird z.B. nach Eindringen in die Zelle in den freien Farbstoff gespalten und verliert hierbei seine Zellmembranpermeabilität. Dadurch kommt es zu einer Anreicherung des impermeablen Fluoreszenzfarbstoffes in der Zelle. In diesem Fall kann der fluoreszente Überstand 3 durch eine Fluoreszenzfarbstoff-freie Lösung 3a ausgetauscht werden, ohne die spezifische Zellfluoreszenz zu verändern. Die unspezifische Hintergrundfluoreszenz des Überstandes wird auf diese Weise entfernt. FURA2-AM färbt jedoch Reaktionsgefäße nachhaltig an (Wandfluoreszenz)

und erzeugt so ein anderes unspezifisches Fluoreszenzsignal, das der Hintergrundfluoreszenz von Verteilungsfarbstoffen vergleichbar ist. Dieser Sachverhalt ist in Fig. 8 dargestellt. In diesem Fall geht also die Hintergrundfluoreszenzstrahlung 8 auf die an den Gefäßwänden anhaftenden Fluoreszenzfarbstoffmoleküle 4 zurück. Durch Ein-  
5 bringung von Maskierungsfarbstoffen in den Fluoreszenzfarbstoff-freien Überstand 3a kann auch dieses unspezifische Fluoreszenzsignal vollständig unterdrückt werden.

In Fig. 10 ist zusätzlich ein zu Fig. 2 analoges Ausführungsbeispiel dargestellt, bei dem die auf einem transparenten Träger am Boden 2 des Reaktionsgefäßes 1 auf-  
10 brachte biologische Schicht aus Rezeptoren 12 besteht, die mit den im Überstand (Lösung) 3 vorhandenen, Fluoreszenz- oder Lumineszenz-markierten Liganden 13 eine spezifische Bindung eingehen. Die gebundenen Liganden sind hier mit 14 bezeichnet. Das durch den Boden 2 eingestrahelte Primärlicht 6 regt im Falle der nicht maskierten Lösung die Fluoreszenz-markierten Liganden 13 und 14 zur Fluoreszenz  
15 an. Im Falle von Lumineszenz-markierten Liganden entfällt das Primärlicht 6. Analog zur Ausführung nach Fig. 2 wird der Lösung 3 wiederum ein Maskierungsfarbstoff beigefügt, der dafür sorgt, daß die von den ungebundenen Liganden 13 ausgehende Fluoreszenz- oder Lumineszenzstrahlung in der Lösung vollständig absorbiert wird. Die am Boden 2 erfaßte Fluoreszenz- oder Lumineszenzstrahlung 15, d.h. der Meß-  
20 effekt, geht daher ganz überwiegend auf die an die Rezeptoren 12 gebundenen Liganden 14 zurück und wird nicht durch die Hintergrundstrahlung der ungebundenen Liganden 13 in der Lösung 3 verfälscht. Das Meßsignal ist daher ein direktes Maß für die Stärke der Ligand-Rezeptorbindung. Dabei liegt die Schichtdicke der Rezeptorschicht im nm-Bereich, während die Dimensionen des darüber befindlichen Über-  
25 standes in der Größenordnung mehrerer mm liegt.

Gemäß Fig. 6 und 7 kann die für die Lösung durchlässige Trennschicht 10 in ganz analoger Weise bei der Untersuchung von Liganden-Rezeptorbindungen zur Mas-  
kierung bzw. Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz bzw. -lumineszenz einge-  
30 setzt werden. In diesem Fall wird die störende Hintergrundfluoreszenz bzw. -lumineszenz durch die Trennschicht 10 abgeschirmt und im Falle von lumineszenten Liganden Strahlungsanteile 11 des von gebundenen Liganden stammenden Lumineszenzlichts in Richtung auf den Detektor reflektiert und damit das Nutzsignal verstärkt.

Der in klassischen pharmakologischen Rezeptorbindungsstudien hinsichtlich seiner Bindungsstärke zu bewertende, nicht fluoreszierende bzw. lumineszierende Reaktionspartner wurde hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

### Patentansprüche

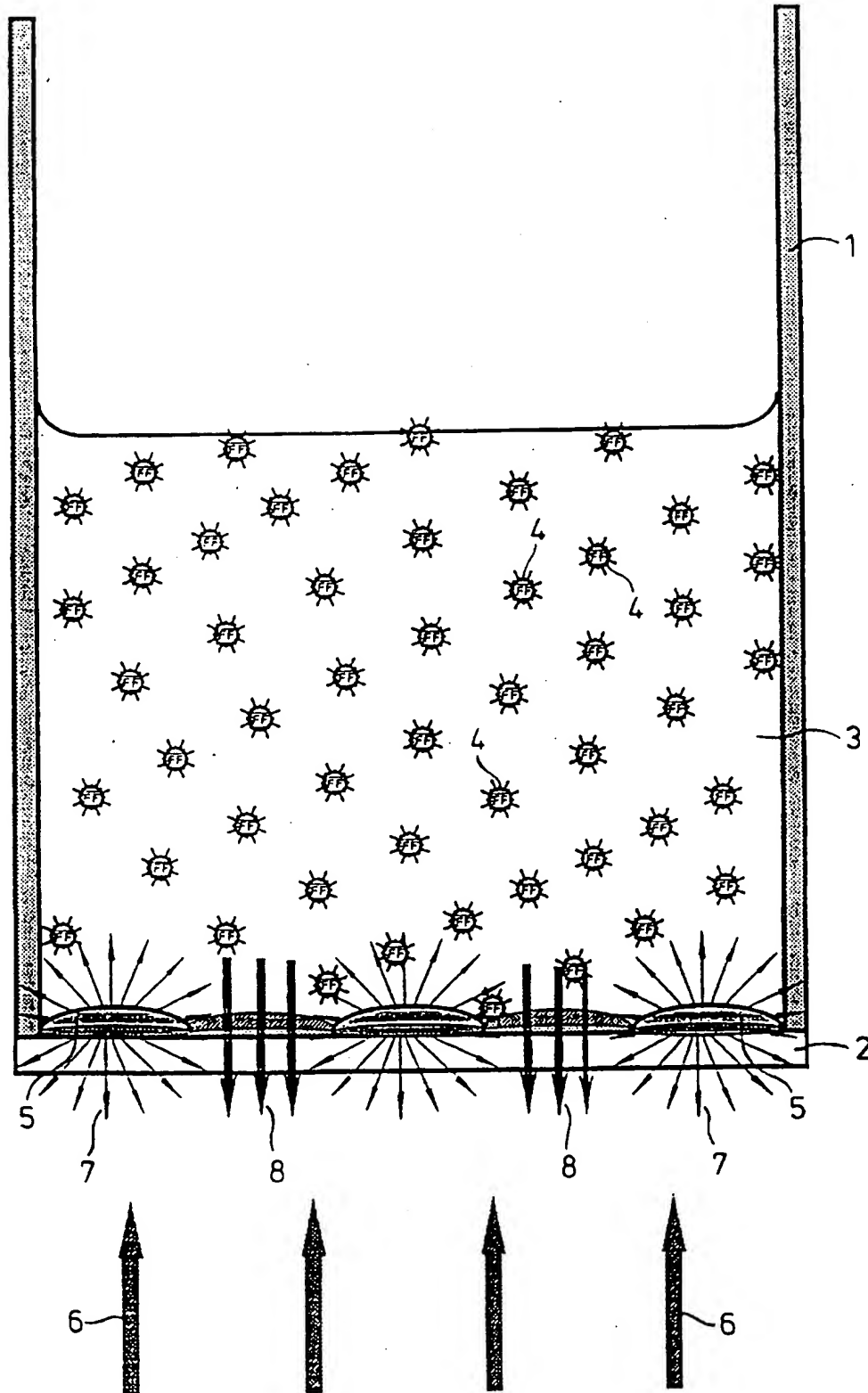
1. Verfahren zur quantitativen optischen Analyse von fluoreszenzmarkierten biologischen Zellen (5), die in Form einer zusammenhängenden Zellschicht auf  
5 einem transparenten Träger am Boden (2) eines Reaktionsgefäßes (1) aufgebracht sind und mit einer den Fluoreszenzfarbstoff (4) enthaltenden Lösung (3) in Kontakt stehen, oder von lumineszenten, biologischen Zellen in Form einer zusammenhängenden, auf dem transparenten Träger befindlichen Zellschicht, dadurch gekennzeichnet, daß der Lösung (3) zusätzlich zu dem bereits  
10 vorhandenen Fluoreszenzfarbstoff (4) ein Maskierungsfarbstoff (9) hinzugegeben wird, welcher das Anregungslicht (6) für den Fluoreszenzfarbstoff (4) und/oder sein Emissionslicht (7) absorbiert und/oder daß auf die Zellschicht eine für die Lösung durchlässige Trennschicht (10) aufgebracht wird, die das  
15 Anregungslicht (6) für den Fluoreszenzfarbstoff (4) und/oder sein Emissionslicht (7) absorbiert und/oder reflektiert oder im Falle der lumineszenten Zellschicht das Lumineszenzlicht reflektiert.
2. Verfahren zur quantitativen optischen Analyse von Fluoreszenz- oder Lumineszenz-markierten Reaktionspartnern in einem mit einer Lösung (3) gefüllten  
20 Reaktionsgefäß (1), in der ein fluoreszierender oder lumineszenter Ligand (13) gelöst ist und die Lösung (3) mit einer für diesen Ligand (13) spezifischen, auf einem transparenten Träger am Boden (2) des Reaktionsgefäß (1) aufgebracht  
25 ten oder sich darauf absetzenden Rezeptorschicht (12) in Kontakt steht, deren für die Rezeptor-Liganden Bindung charakteristische Fluoreszenz- oder Lumineszenzstrahlung (7,15) durch den transparenten Boden (2) hindurch erfaßt und ausgewertet wird, dadurch gekennzeichnet, daß der Lösung (3) ein  
30 Maskierungsfarbstoff (9) hinzugefügt und/oder auf die Rezeptorschicht (12) eine für die Lösung (3) durchlässige Trennschicht (10) aufgebracht wird, wobei die optischen Eigenschaften des Maskierungsfarbstoffs (9) und/oder der  
Trennschicht (10) so gewählt werden, daß das Anregungslicht (6) für den Fluoreszenzfarbstoff (4) des in der Lösung (3) vorhandenen Liganden (13) und/oder sein Fluoreszenzlicht (8) oder sein Lumineszenzlicht von der Lösung

(3) oder der Trennschicht (10) absorbiert oder an der Trennschicht (10) reflektiert wird.

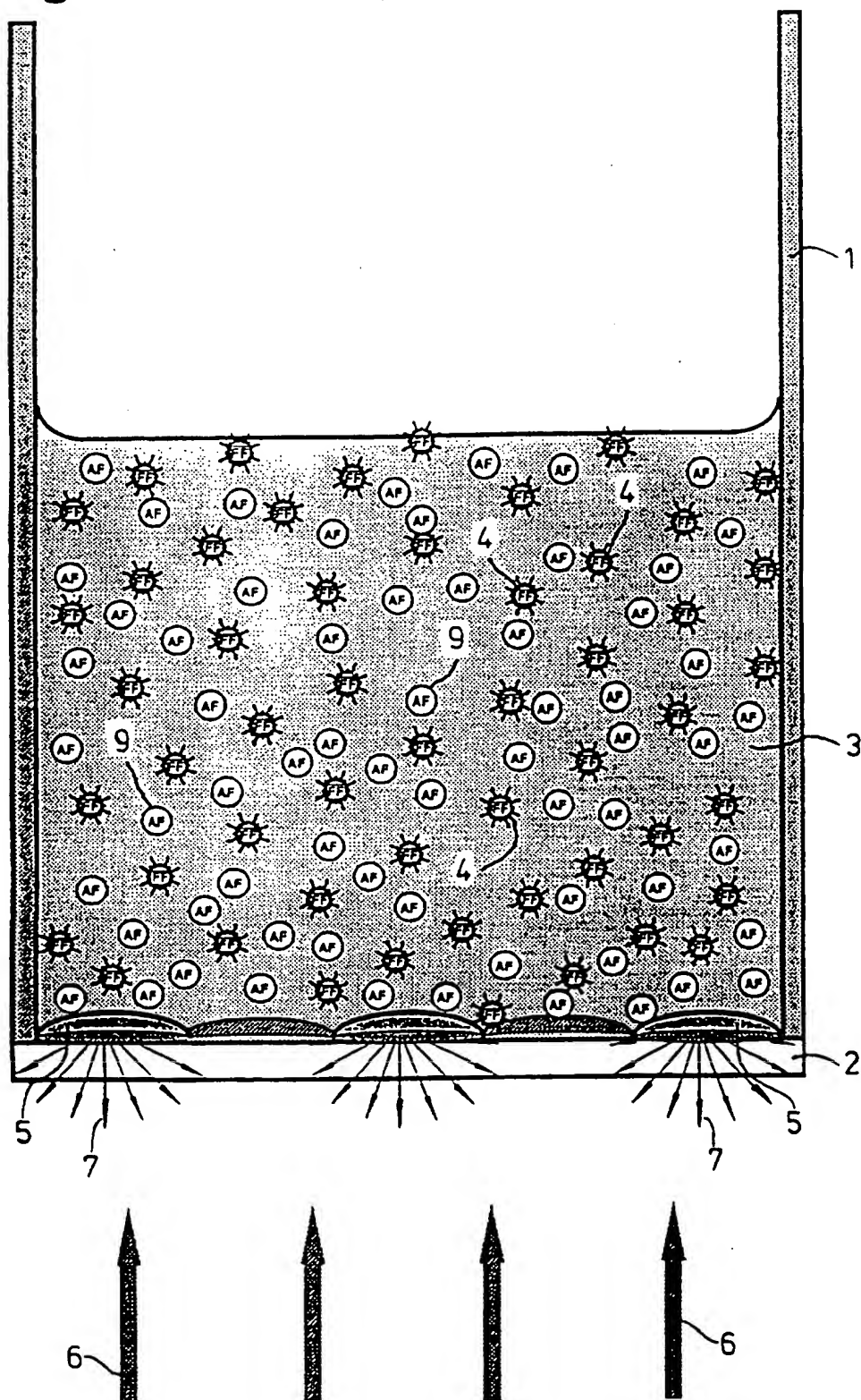
3. Verfahren nach Anspruch 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet daß als Trennschicht (10) eine Schicht aus polymeren Latexkügelchen verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet daß die polymeren Latexkügelchen mit einem Maskierungsfarbstoff gefärbt sind.
5. Verfahren nach Anspruch 1 - 2, dadurch gekennzeichnet daß ein Maskierungsfarbstoff verwendet wird, der eine gute Wasserlöslichkeit und keine zelltoxischen Nebeneffekte aufweist.
6. Verfahren nach Anspruch 1 - 2, dadurch gekennzeichnet daß bei einem Austausch des einen Fluoreszenzfarbstoff (4) enthaltenden Überstandes (3) durch eine Fluoreszenzfarbstoff-freie Lösung (3a) ein Maskierungsfarbstoff zugegeben wird, welcher die unspezifische, von der angefärbten Reaktionsgefäßwand ausgehende Fluoreszenz unterdrückt.



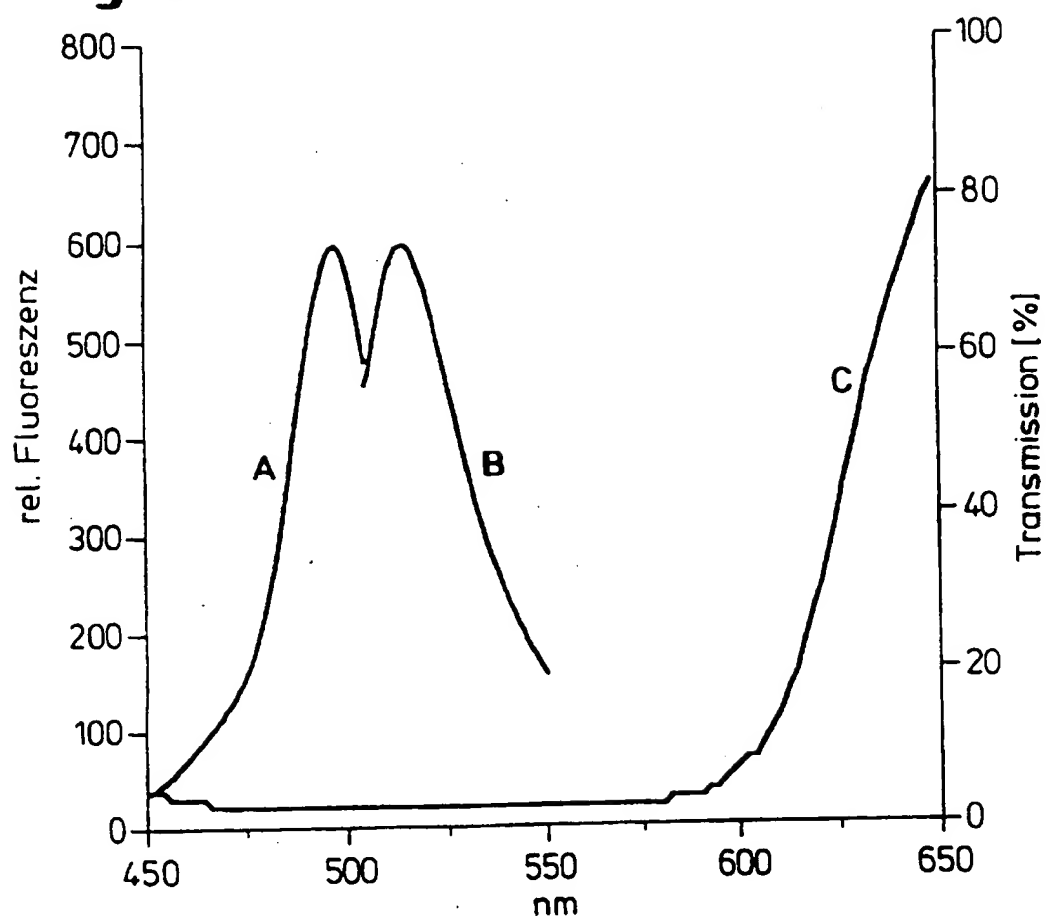
„ 1 / 10 “

**Fig. 1**

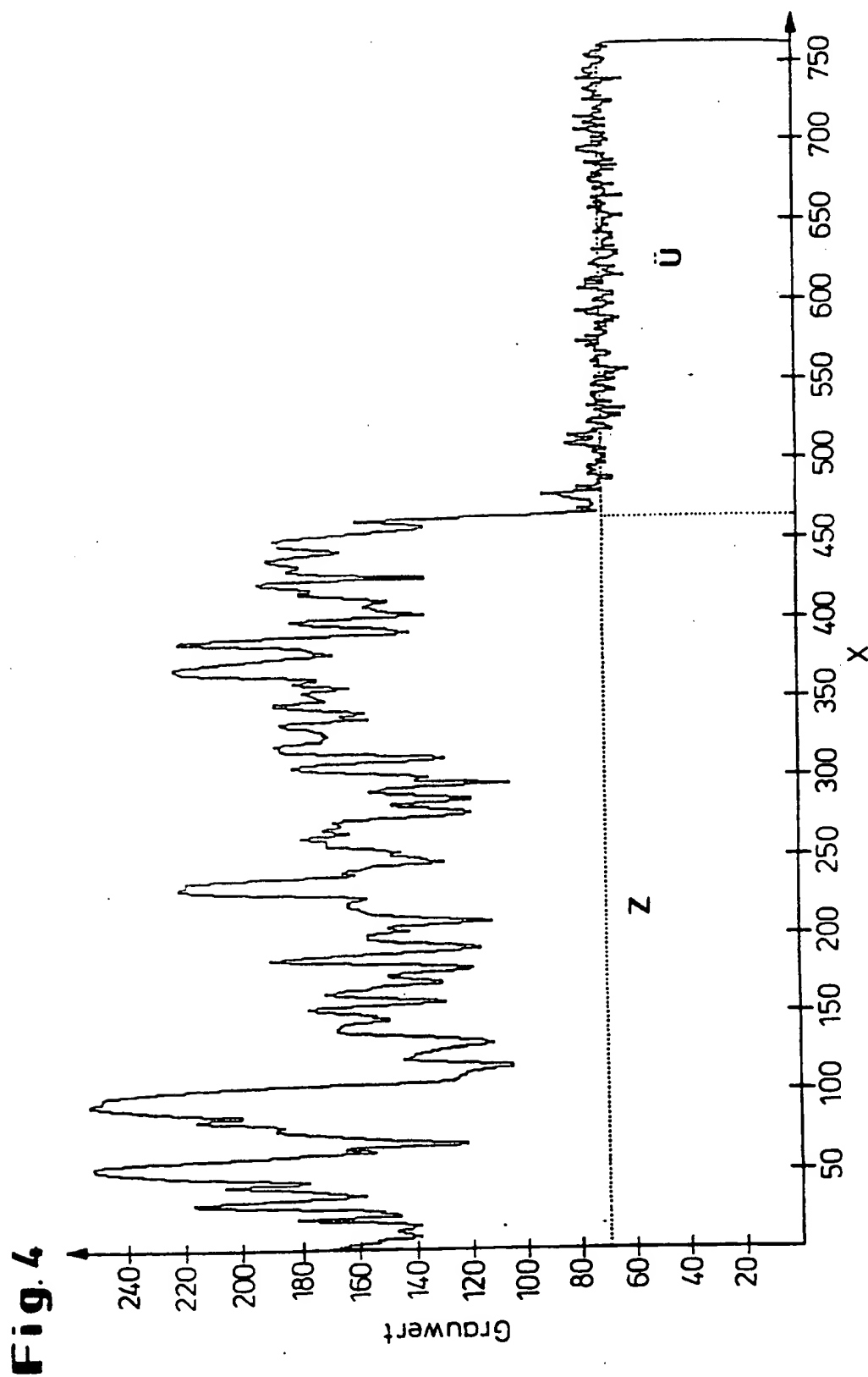
„ 2 / 10 “

**Fig. 2**

„ 3 / 10 “

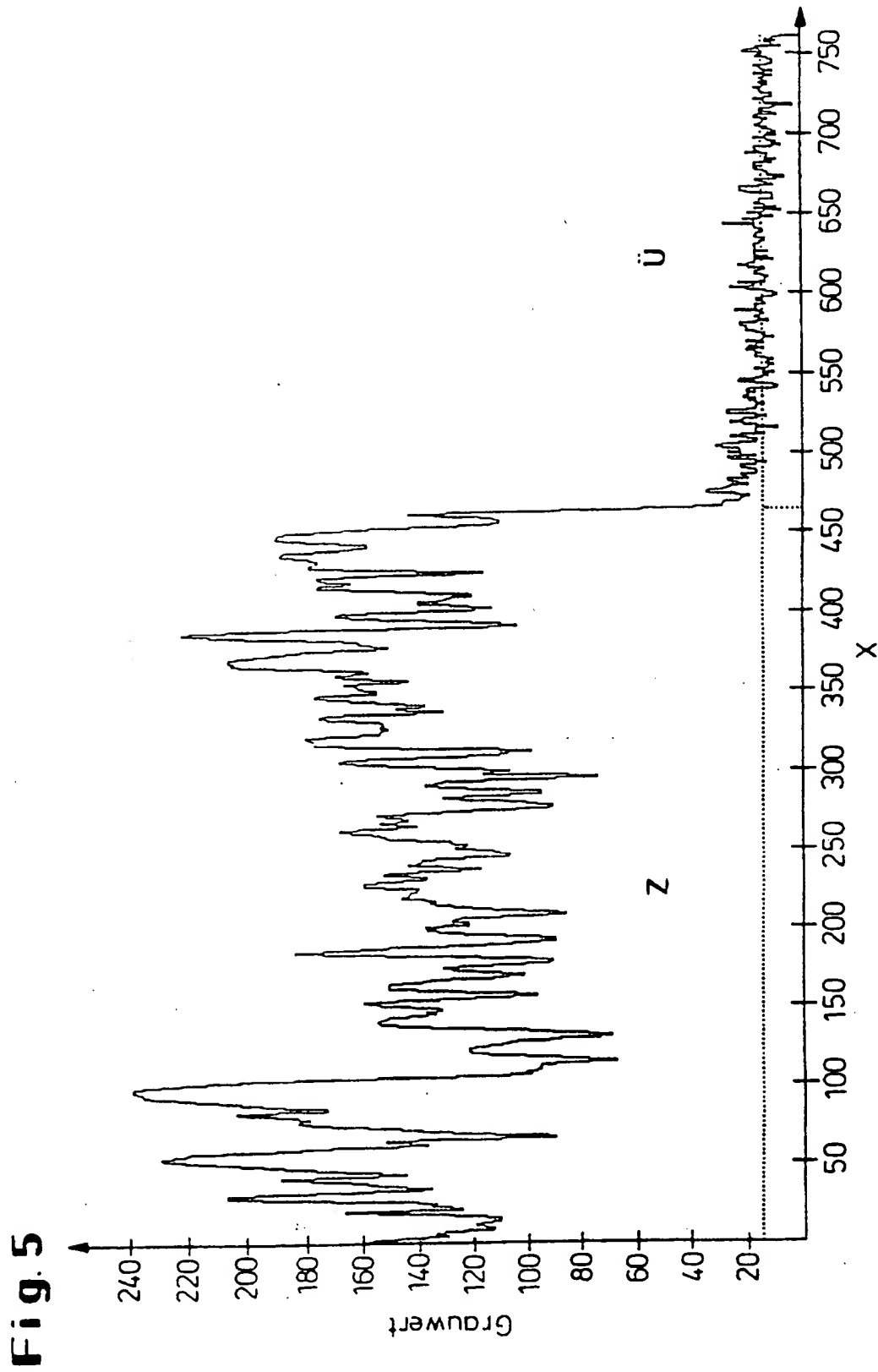
**Fig. 3**

.. 4 / 10 ..

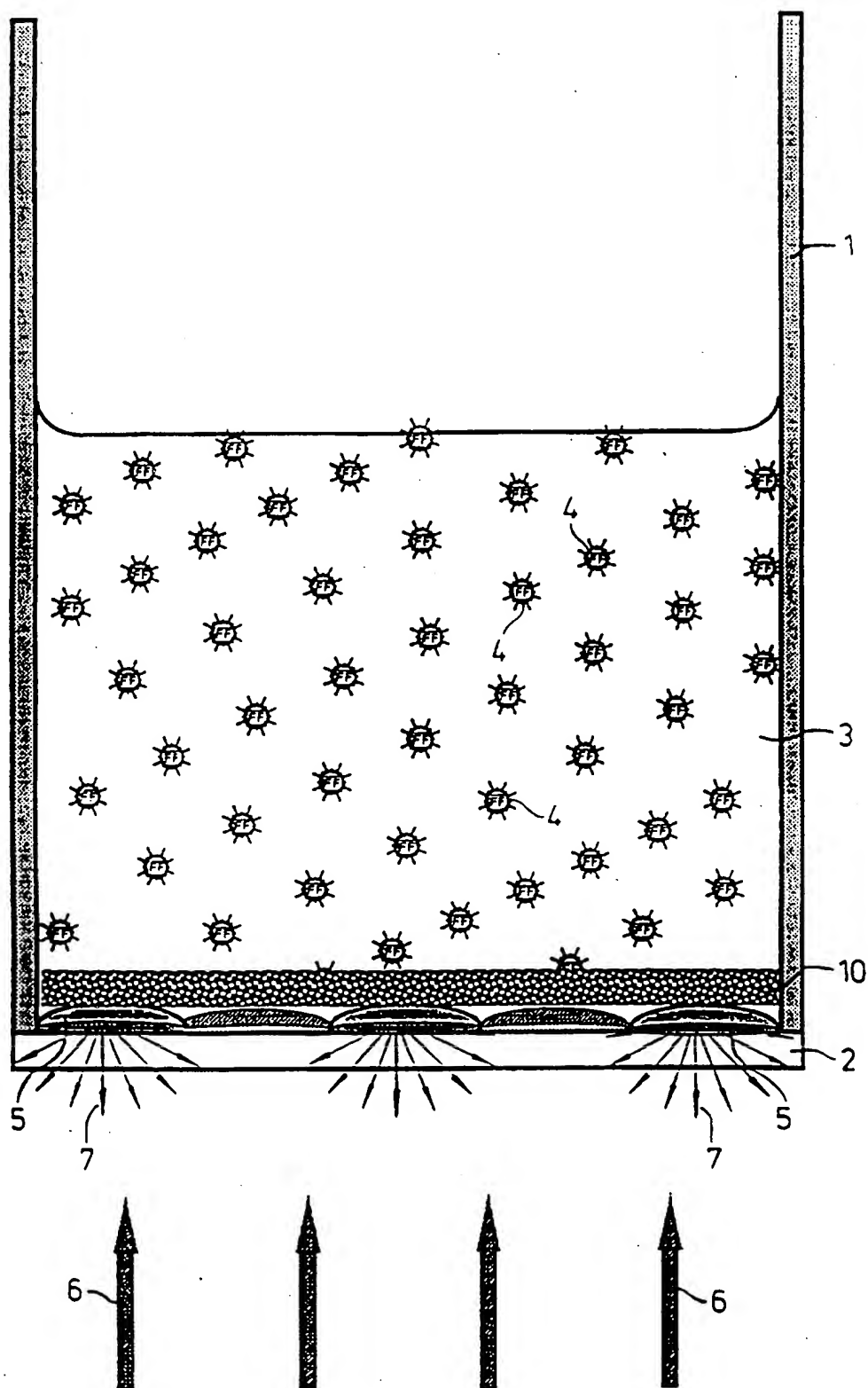


ERSATZBLATT (REGEL 26)

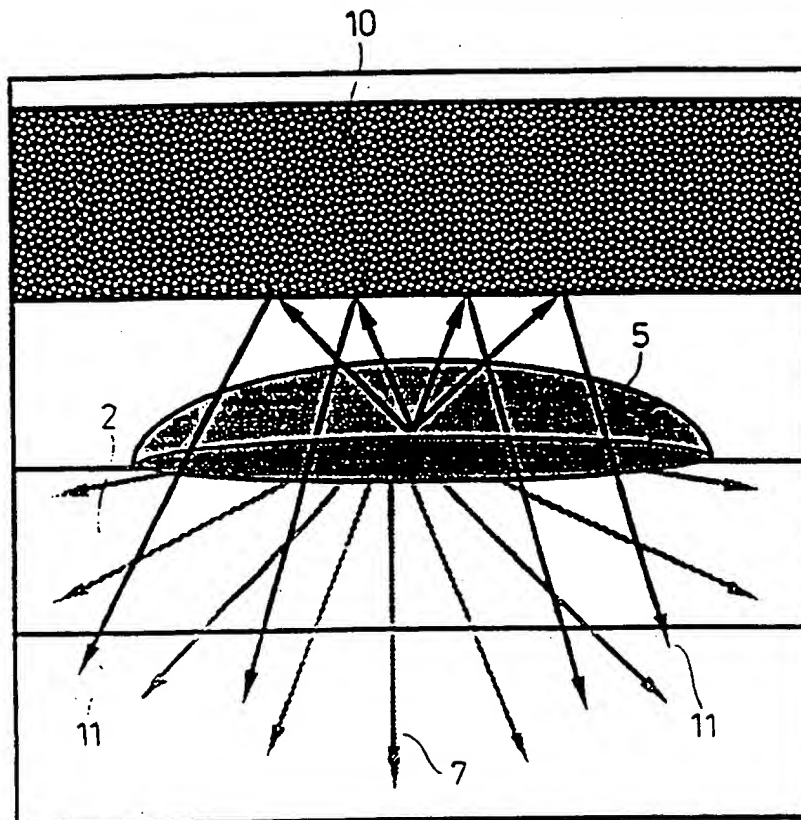
„ 5 / 10 “



.. 6 / 10 "

**Fig. 6**

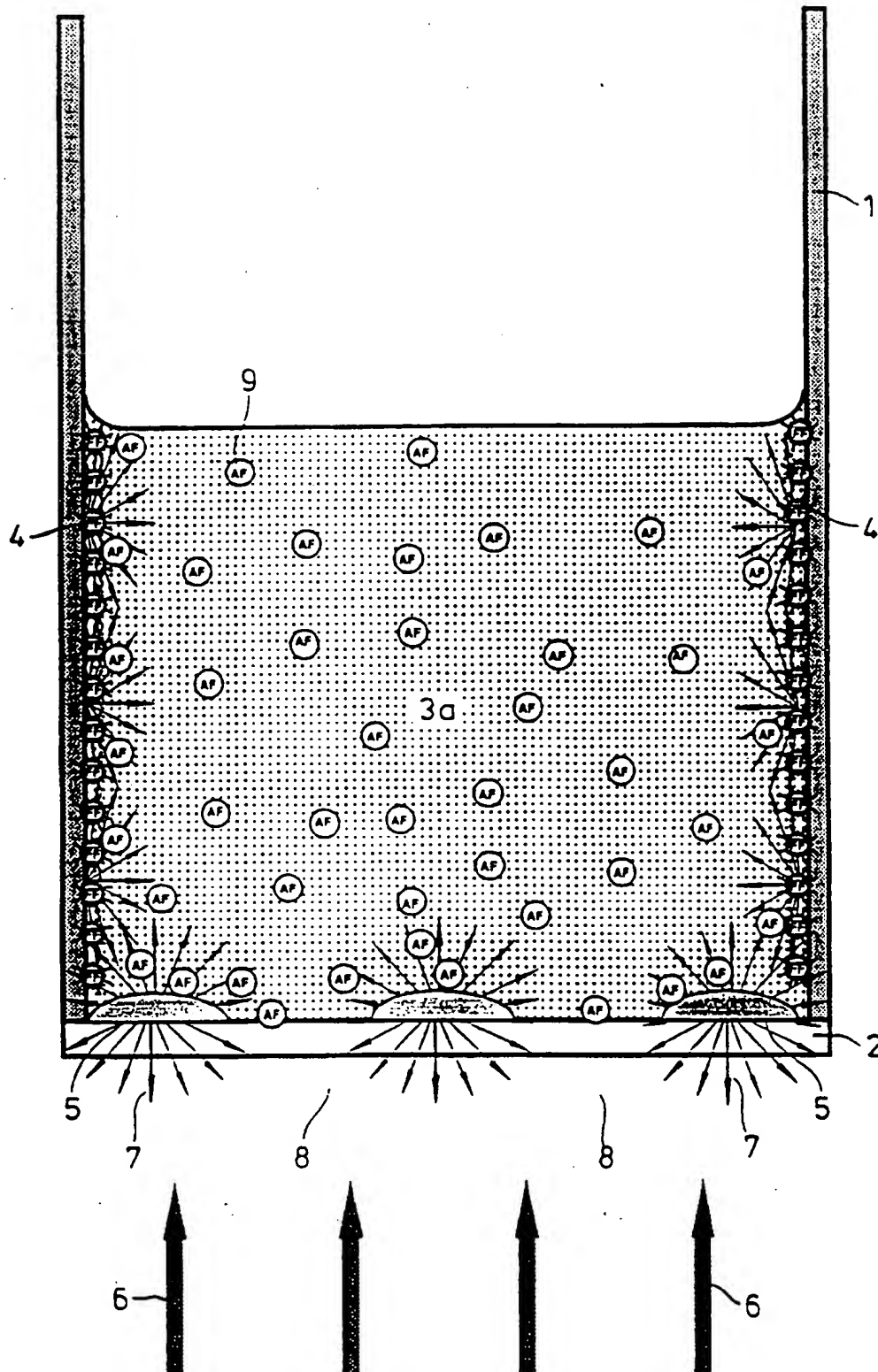
„ 7 / 10 “

**Fig. 7**

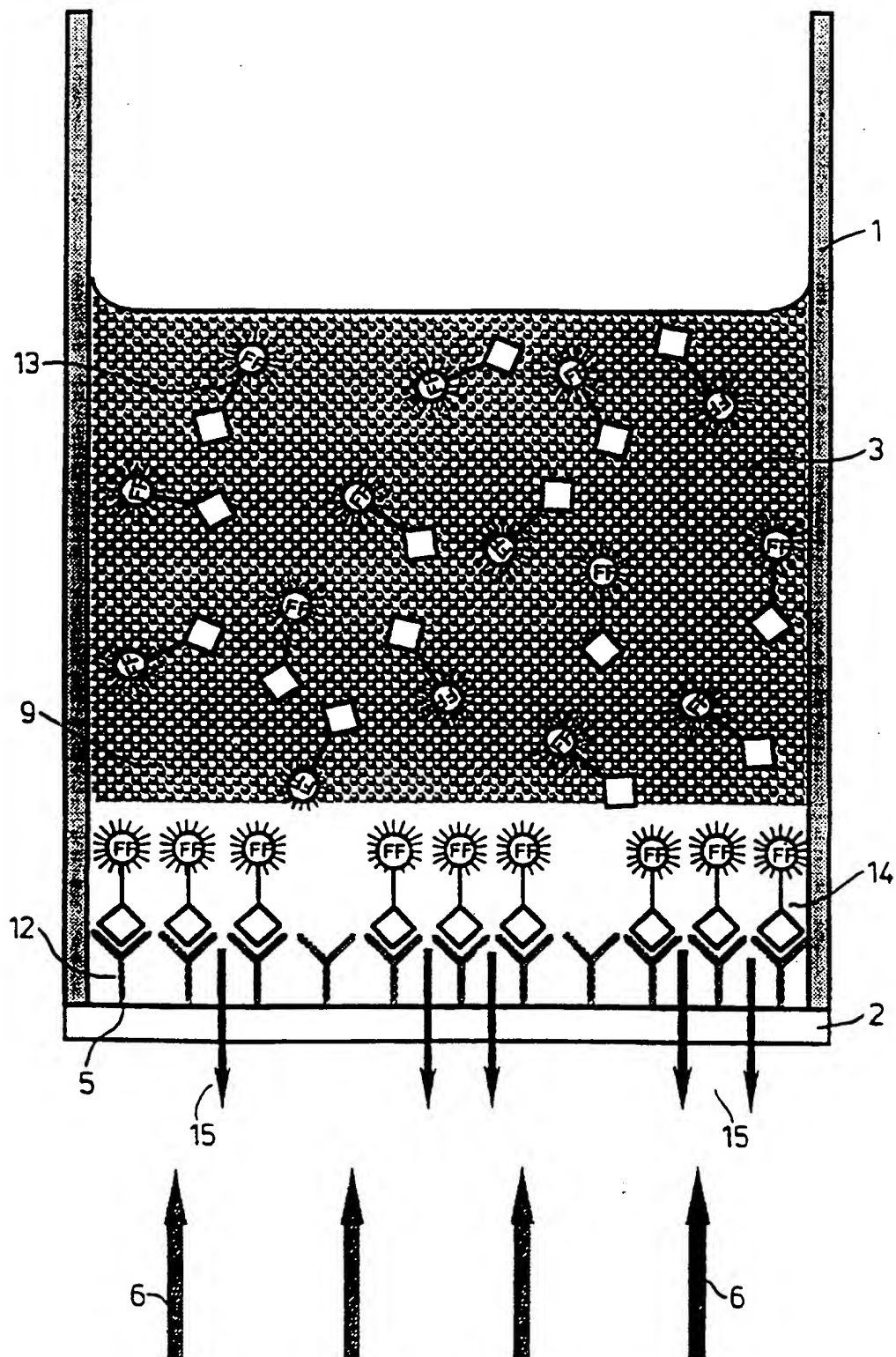




„ 9 / 10 “

**Fig. 9**

„10/10“

**Fig. 10**

ERSATZBLATT (REGEL 26)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 97/02662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 6 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 02642 A (APROGENEX INCORPORATED) 3 February 1994 see page 4, line 4 - line 18; claims 1,10,18-23 see page 5, line 1 - line 14 see page 7, line 11 - line 29	1,2
A	-----	3-6

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 September 1997

Date of mailing of the international search report

06. 10. 97

Name and mailing address of the ISA  
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/02662

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9402642 A	03-02-94	AU 4681393 A	14-02-94
		AU 4775193 A	14-02-94
		EP 0662151 A	12-07-95
		MX 9304354 A	31-01-95
		WO 9402644 A	03-02-94
		US 5582982 A	10-12-96
-----			

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/02662

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 6 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 94 02642 A (APROGENEX INCORPORATED) 3. Februar 1994 siehe Seite 4, Zeile 4 - Zeile 18; Ansprüche 1,10,18-23 siehe Seite 5, Zeile 1 - Zeile 14 siehe Seite 7, Zeile 11 - Zeile 29	1,2
A	-----	3-6

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. September 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06. 10. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Van Bohemen, C

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/02662

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9402642 A	03-02-94	AU 4681393 A	14-02-94
		AU 4775193 A	14-02-94
		EP 0662151 A	12-07-95
		MX 9304354 A	31-01-95
		WO 9402644 A	03-02-94
		US 5582982 A	10-12-96
-----			